Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Institutes
München
Vorstand: Professor Dr. A. Hahn.

Beiträge zur Hemmung der Glykolyse durch Sauerstoff

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wilhelm Panwolf
aus Langenhaslach
1939

Münchner-Kindl-Druckerei

Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Institutes
München
Vorstand: Professor Dr. A. Hahn.

Beiträge zur Hemmung der Glykolyse durch Sauerstoff

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wilhelm Panwolf
aus Langenhaslach
1939

Münchner Kindl-Druckerei.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximiliansuniversität München.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern gewidmet!

I. Theoretischer Teil

Unter Glykolyse versteht man einen Vorgang, bei dem das Glykogen des Muskels bei Fehlen von Sauerstoff in Milchsäure aufgespalten wird.[1]) Im Gegensatz dazu wird die Milchsäurebildung bei Gegenwart von Sauerstoff in der Muskelzelle gehemmt, ja vielleicht nicht nur in der Muskelzelle allein, sondern in allen normal funktionierenden Zellen, wie Hahn und Dürr[2]) z. B. bei Hefezellen nachwiesen. Es handelt sich hier also ohne Zweifel um eine wichtige Erscheinung über die man sich wissenschaftlich lange im unklaren war, weil man einen Zusammenhang im Sinne einer „gekoppelten Reaktion"[3]) annahm, wie beim Erholungsvorgang im Muskel, zwischen einer gleichzeitigen Oxydation eines Teiles der Milchsäure und der Bildung von Glykogen aus Milchsäure. Weil man sich über das Wesen einer gekoppelten Reaktion nicht genügend klar gewesen ist, war diese Deutung in beiden Fällen möglich. Jedoch[4]) wurde, was die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff anlangt, experimentell am Muskel bewiesen, daß der Vorgang nicht so angenommen werden kann wie oben gedeutet.

Aus den Versuchen ergab sich, daß grundsätzliche Unterschiede bestehen zwischen Erholung im Muskel und Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff, weil der Erholungsvorgang von der Muskelstrukturerhaltung abhängt, während dies bei der Hemmung der Milchsäurebildung durch O_2 nicht in demselben Maße der Fall ist. Zunächst kann der Erholungsvorgang physikalisch-chemisch

nicht gedeutet werden, da man bis heute den Begriff der Struktur unter einfachen physikalisch-chemischen Gesichtspunkten nicht betrachten kann.

Hahn,[5]) Fischbach und Niemer fanden experimentell, daß im Muskelbrei bei Anwesenheit von Sauerstoff die anfangs vorhandene Milchsäure konstant blieb, also keine weitere Milchsäure mehr gebildet wurde. Ebenso wenig nahmen bei Gegenwart von Sauerstoff die Kohlehydrate des Muskelbreies zu, während nach der Resynthese Meyerhof's eine Vermehrung der Kohlehydrate bei der Erholung des intakten Muskels stattfindet.

Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff im Muskel zum Verschwinden gebracht werden kann, wenn er entsprechend ausgewaschen wird. Fügt man das Waschwasser wieder hinzu, so wird die hemmende Wirkung des Sauerstoffes wieder hergestellt. Hieraus kann gefolgert werden, daß der verantwortliche Stoff für die Sauerstoffwirkung im Muskelwaschwasser enthalten ist. Es gelang fernerhin, diesen Stoff durch Acetonfällung vom Eiweiß zu trennen und ihn in einer Fällung aus Bariumphosphat als Dauerpräparat herzustellen.

Durch Auswaschen des Muskels kommt die Muskelzelle hinsichtlich der Milchsäurebildung in einen der Karzinomzelle ähnlichen Zustand, bei der nach Warburg[6]) stets die hemmende Wirkung des Sauerstoffes auf die Milchsäurebildung fehlt, die Glykolyse also trotz der Gegenwart von Sauerstoff relativ groß ist.

Weiter wurde bei länger stehendem, fein zerkleinertem Muskel ein langsames Verschwinden der Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff beobachtet. Die Hemmung der Milchsäurebildung tritt jedoch wieder ein durch Zusatz von zersetzter Bariumfällung oder eines Stoffes in Form der Lösung A. — Unter Lösung A versteht man ein durch Aceton eiweißarm gemachtes Muskelwaschwasser, in dem der Stoff, der bei der Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff zugegen sein muß, enthalten ist. — Zum näheren Studium der Wirkung des angenommenen Stoffes, eignete sich stehengelassener zerkleinerter Muskel besser, als ausgewaschener Muskel, weil

in ersterem die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff meistens absolut ist.

Neuerdings konnte man ferner beobachten, daß durch Zusätze von Stoffen, die die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff wieder herstellen, keine Atmungssteigerung des Muskels bewirkt wird. In dem zerkleinert stehengelassenen Muskel hemmt Sauerstoff die Milchsäurebildung nicht mehr; er atmet also wie ein frischer Muskel. Bei Zusatz von Lösung A ist Milchsäurebildung bei Gegenwart von Sauerstoff gänzlich aufgehoben. Der Muskel atmet jedoch nicht mehr als ohne Zusatz.

Wie Warburg zeigte, verschwindet in Sauerstoff die Milchsäurebildung ganz oder teilweise. Dieser Vorgang wurde von ihm „Pasteursche Reaktion" genannt. Nach Meyerhof wird der größte Teil der durch Glykolyse entstandenen Milchsäure durch aufgenommenen Sauerstoff im Muskel wieder zu Glykogen aufgebaut, während der Rest zu CO_2 und H_2O verbrennt. Er bezieht also den Gesamtverbrauch an Sauerstoff im zerkleinerten Muskel auf die durch Sauerstoff veranlaßte Hemmung der Milchsäurebildung und setzt die Milchsäuremenge, die bereits verbrannt sein könnte, durch den aufgenommenen Sauerstoff in Beziehung zu der Menge an Milchsäure, die am Entstehen verhindert wurde. Er bildet den Quotienten

$$Q = \frac{\text{Total verschwundene Milchsäure}}{\text{Oxydierte Milchsäureaequivalente.}}$$

mit dem Zahlenwert 4—5;[7]).

Hahn, Belmonte, und Niemer zeigten bereits 1931 im Gegensatz zu Meyerhof, daß diese Resynthese von Glykogen aus Milchsäure an die Struktur der Muskelfibrillen an die erhaltene Struktur des intakten Muskels gebunden ist. Ferner konnten sie eine Konstanz des so errechneten Quotienten nicht beobachten. Sollte die Meyerhof'sche Annahme aber trotzdem stimmen, so wäre es eigenartig, daß die Atmungsgröße des Muskels durch das Herbeiführen der Hemmung der Milchsäurebildung in keiner Weise beeinträchtigt würde.

Die heute bereits bekannten Tatsachen sprechen dafür, daß ein Zusammenhang zwischen Hemmung der Milch-

säurebildung durch Sauerstoff und einer gleichzeitigen Oxydation von Milchsäure bzw. der aequivalenten Menge Kohlehydrate nicht besteht.

Worin die hemmende Wirkung des Sauerstoffes beruht, ist bis heute noch unklar und soll erst durch weitere Versuche einer näheren Betrachtung unterzogen werden.

II. Praktischer Teil

Wie bereits kurz erwähnt wurde, ist die Resynthese von Milchsäure zu Glykogen auf das engste mit der erhaltenen Struktur des Muskels verbunden. Schon eine einmalige quere Durchschneidung des Muskels bewirkt eine Senkung der Bildung von Kohlehydraten aus Milchsäure auf ungefähr ein Achtel gegenüber der des unzerschnittenen Muskels, wie aus folgender Tabelle ersichtlich ist. Dagegen wird die Resynthese durch Längsdurchschneidung eines Muskels kaum merklich beeinflußt.

In folgenden Versuchen wurden nach dreistündiger Digestion in Ringerlösung bei 37° die Kohlehydrate bestimmt; die Ringerlösung hatte in den Versuchen mit Laktat einen Gehalt von 5prozentigem Lithiumlaktat.

Tabelle 1

(mg. Kohlehydrate)

Unzerschnitten			Querzerschnitten			Längszerschnitten		
Ohne Laktat	Mit Laktat	Kohlehydratvermehrung mit Laktat	Ohne Laktat	Mit Laktat	Kohlehydratvermehrung mit Laktat	Ohne Laktat	Mit Laktat	Kohlehydratvermehrung mit Laktat
16,6	18,5	1,9	11,8	11,8	0,0	11,1	15,6	4,5
20,3	22,4	2,1	13,0	13,2	0,2	13,2	14,5	1,3
15,5	18,8	3,3	10,9	11,0	0,1	15,2	15,7	0,5
13,6	16,9	3,3	12,5	12,7	0,2	12,1	13,4	1,3
24,6	25,8	1,2	6,8	6,8	0,0	13,1	17,7	4,6
20,0	21,6	1,6	9,8	10,6	0,8	19,0	19,3	0,3
20,3	23,1	2,8	9,9	10,3	0,4	17,2	18,1	1,1
17,1	20,6	3,5	11,7	12,3	0,5	12,5	19,9	7,4
18,3	19,3	1,2	14,8	15,3	0,5	13,6	18,3	4,7
12,5	13,9	1,4	17,1	17,2	0,1	17,1	19,2	2,1
18,7	20,6	2,9	13,1	14,4	1,3			
19,6	21,6	2,0	14,4	14,4	0,0			
21,5	25,2	3,7	10,8	11,1	0,3			
17,6	21,8	4,2	12,1	11,0	1,1			
17,3	19,6	2,3	14,7	15,0	0,3			
13,8	17,5	3,7	13,0	14,7	1,7			
16,3	17,8	1,5	13,2	12,8	0,4			
16,7	19,6	2 9	4,5	5,6	1,1			
12,6	16,1	3,5	12,7	12,7	0,0			
11,0	14,9	3,9	9,0	8,2	0,8			
14,1	16,4	2,3	8,6	10,1	1,5			
9,3	14,1	4,8	8,6	9,2	0,6			
14,0	15,3	1,3	13,1	14,0	0,9			
			10,5	10,7	0,2			
Mittelwert:		2,62			0,35	Mittelwert:		2,78

Hahn und Niemer[8]) bewiesen in weiteren Versuchen, daß bis heute noch unbekannte Stoffe eine Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff im Muskelbrei bewirken. Sie nahmen frischen Rindsmuskel von einem Jungtier, zerkleinerten ihn mittels einer Fleischmaschine und schüttelten ihn mit Zugabe der doppelten Gewichtsmenge Phosphatpuffer (pH = 7; m/15) eine Stunde lang auf der Schüttelmaschine. Dann wurde das Gemenge durch ein Tuch filtriert und der Muskelrückstand in einer Fruchtpresse ausgepreßt. Die gewonnene Waschflüssigkeit bezeichnete man mit Waschsaft. Zu einer Versuchsanordnung wurden drei große Reagenzgläser beschickt mit je 5 Gramm ausgepreßtem Muskel und 25 ccm Waschsaft. Glas II und III wurden evakuiert und eines davon am Gasometer mit Sauerstoff gefüllt, während man aus Glas I, dem sog. Nullversuch, gleich die zu Versuchsbeginn vorhandene Milchsäure bestimmte. Glas II und III schüttelte man 2—3 Stunden lang im Thermostaten bei 37° und unterbrach hierauf die Reaktion, indem man den Inhalt der Gläser mit Zugabe von 20 ccm 4,4 prozentiger Salzsäurelösung und 40 ccm einer gesättigten Sublimatlösung enteiweißte. Die Reaktion des Kontrollversuches wurde bereits zu Beginn der Digestion auf die gleiche Weise unterbrochen.

Die Milchsäurebestimmung wurde nach der Methode von Friedemann[9]), Cotonio, Shaffer und Graeser[10]) ausgeführt.

I. Versuch mit Muskel allein:

5 g Muskel;
25 ccm Phosphatpuffer (pH = 7; m/15)

II. Versuch mit Waschsaft:

25 ccm Waschsaft;

III. Versuch mit Muskel und Waschsaft:

5 g Muskel;
25 ccm Waschsaft.

Man digerierte drei Stunden bei 38°.

Tabelle 2.

(mg Milchsäure).

I. Muskel			II. Waschsaft			III. Muskel u. Waschsaft		
direkt	digeriert		direkt	digeriert		direkt	digeriert	
	im Vakuum	mit Sauerstoff		im Vakuum	mit Sauerstoff		im Vakuum	mit Sauerstoff
11,0	15,0	17,6	19,1	30,0	30,0	31,0	50,0	37,9
10,0	25,5	25,5	21,0	43,4	42,2	25,9	85,0	46,0
8,4	14,4	13,2	26,5	47,6	44,5	33,6	61,2	31,2
8,6	25,7	25,4	26,8	55,4	55,4	33,3	84,2	43,7
7,9	19,2	19,2	26,4	56,2	55,2	33,6	76,7	39,6
7,2	18,7	18,5	20,8	50,2	48,0	31,2	73,2	33,6
—	—	—	—	—	—	28,8	85,0	35,6

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, hemmt Sauerstoff bei Muskel und Waschsaft allein die Milchsäurebildung nicht; dagegen sehr wohl in Verbindung mit Muskel und Waschsaft. Der unbekannte maßgebende Stoff ist im Waschsaft enthalten.

Wie weitere Versuche bewiesen, verlor der Waschsaft selbst nach fast völlig gelungener Enteiweißung seine Wirkung nicht.

Zur Enteiweißung ging man so vor, daß man bereits gekühltes Aceton dem ebenfalls vorgekühlten Waschsaft im Verhältnis 5 : 4 zusetzte und die Temperatur des Gemenges nicht über 5° ansteigen ließ, um die Wirksamkeit des Saftes nicht herabzusetzen. Den über Nacht entstandenen Eiweißniederschlag filtrierte man mittels Faltenfilter ab und ließ das Aceton bis auf den letzten Rest im Vakuum eindampfen. Die Temperatur durfte hierbei 40° nicht übersteigen. Die nun übrig gebliebene Flüssigkeit wurde mit Lösung A bezeichnet.

Wie folgende Versuche zeigten, gingen die Milchsäurequellen dem ausgewaschenen Muskel und der Lösung A großenteils verloren. Daher wurde den Versuchen eine

neue Milchsäurequelle in Form von hexosediphosphorsaurem Natrium oder noch besser von Muskelkochsaft hinzugefügt.

Muskelkochsaft wurde aus gleichen Gewichtsteilen von Muskelbrei und Phosphatpuffer (pH = 7; m 15) hergestellt und ca. 4 Minuten zusammen gekocht. Das Filtrat hievon benützte man als Milchsäurequelle.

Versuche mit Lösung A.

I. Versuch mit Muskel und Waschsaft

5 g Muskel
25 ccm Phosphatpuffer (pH = 7; m/15)
20 ccm Kochsaft

II. Versuch mit Muskel, Kochsaft und Lösung A:

5 g Muskel
25 ccm Lösung A
20 ccm Kochsaft.

Tabelle 3.

(mg Milchsäure)

I. Muskel			II. Muskel und Lösung A		
direkt	digeriert		direkt	digeriert	
	im Vakuum	mit Sauerstoff		im Vakuum	mit Sauerstoff
16,0	29,0	27,9	15,0	33,4	22,2
20,4	28,8	28,2	35,2	45,0	32,1
13,5	27,2	26,2	31,2	49,7	40,5
—	—	—	37,5	46,6	33,4

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß in der vollständig enteiweißten Lösung A der unbekannte wirksame Stoff enthalten ist. Wie ferner gezeigt werden konnte, ist dieser selbst dann noch vorhanden, wenn man Lösung A 10 Minuten lang und länger auf 100° erhitzte.

In weiteren Versuchen konnte eine Säureresistenz des gesuchten Stoffes festgestellt werden. Es wurden 80 ccm Lösung A mit 10 prozentiger Schwefelsäure auf 95 ccm aufgefüllt und das Gemisch nach 10—15 Min. mit 10 prozentiger Natronlauge gegen Lakmus neutralisiert. Probeversuche zeigten, daß die so behandelte Lösung A ihre ursprüngliche volle Wirksamkeit beibehielt.

Die Zusammensetzung der Ansätze war mit Ausnahme der mit Schwefelsäure vorbehandelten Lösung A genau so wie in Tabelle 3.

Tabelle 4.

(mg Milchsäure)

I. Muskel			II. Muskel mit angesäuerter Lösung A		
direkt	digeriert		direkt	digeriert	
	im Vakuum	mit Sauerstoff		im Vakuum	mit Sauerstoff
27,4	37,8	37,1	42,1	61,6	38,0
22,6	33,0	32,0	38,0	53,2	35,0
17,9	28,2	28,0	32,4	56,0	41,9

Nun wurde darangegangen durch Dialyse die Lösung A von weiteren Beimengungen als dem unbekannten Stoff zu befreien.

100 ccm Lösung A goß man in einen Zellophanschlauch, der in einen mit Wasser gefüllten Stutzen gehängt wurde. Wie ein Probeversuch ergab, hatte die so behandelte Lösung A ihre Wirksamkeit völlig verloren. Daraus geht hervor, daß der zur Hemmung der Milchsäurebildung verantwortliche Stoff dialysierbar ist, also wahrscheinlich eine kleinere Teilchengröße als 1 $\mu\mu$ in Lösung hat. Auch mit Hilfe des Soxleth'schen Apparates mit Aether oder Chloroform konnte man aus Lösung A keine Stoffe extrahieren. Schließlich kam man auf der Suche nach einer Reindarstellung des unbekannten Stoffes durch folgende Versuchsanordnung einen Schritt weiter.

Mit Liquor plumbi subacetici und mit Bariumacetat gelang es die Phosphate der Lösung A auszufällen, die noch bereits von der nach Soerensen verwandten Phosphatpufferlösung (3,6 g Kaliumphosphat + 7,2 g Natriumphosphat in einem Liter Wasser) stammten. Es mußten solche lösliche Metallsalze zur Zugabe der Lösung A gewählt werden, die unlösliche Metall-Phosphatverbindungen ergeben.

Ca. 100 ccm Liquor plumbi subacetici werden zu 150 ccm Lösung A gegeben. Bald entsteht ein dicker Niederschlag von Bleiphosphat. Die aus dem Gemenge mittels Zentrifuge gewonnene überstehende klare Flüssigkeit macht, wie Untersuchungen zeigten, mit dem Muskel keine Hemmung der Milchsäurebildung mehr. Der gesuchte Stoff muß sich also im Zentrifugenrückstand befinden. Der Zentrifugenrückstand wird zwei bis dreimal mit Phosphatpuffer (pH = 7; m/15) aufgeschlämmt und mit Wasser im Meßzylinder bis zur Marke 100 aufgefüllt. Hierauf läßt man 15—20 Minuten lang aus dem Kipp'schen Apparat unter dauerndem Schütteln Schwefelwasserstoff in die Aufschlämmung einströmen. Am darauffolgenden Morgen nachdem die Bleifällung ziemlich vollständig geworden ist, wird das vom inzwischen ausgefallenen Bleisulfid durch Filtration getrennte klare Filtrat im Vakuum bei 40° solange eingedampft, bis sich mit Bleiazetat kein Schwefelwasserstoff mehr nachweisen läßt.

Diese somit gewonnene Lösung hat jedoch ebenfalls mit Muskel zusammen seine Wirkung verloren. Vielleicht hemmt oder zerstört gar Schwefelwasserstoff den gesuchten Stoff in seiner Wirkung.

Im Gegensatz hierzu erwies sich die Fällung mit Bariumazetat als brauchbar.

500 ccm Lösung A werden mit ungefähr 150 ccm einer kaltgesättigten Bariumazetatlösung versetzt. Der hierbei entstehende Niederschlag von Bariumphosphat wird auf der Nutsche unter starkem Absaugen mit der Wasserstrahlpumpe abgepreßt. Im Filtrat fand man neben Kreatin fast die gesamte Milchsäure der Lösung A. Auch hier fiel bei Versuchen mit Filtrat und Muskel die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff aus. Sollte der für die Hemmung verantwortliche Stoff durch die Fällung nicht zerstört werden, so muß er im Nutschenrückstand

vorhanden sein und zwar entweder als unlösliches Bariumsalz oder adsorbiert an die Bariumphosphate.

Um selbst die letzten Milchsäurereste aus dem Nutschenrückstand zu entfernen, wusch man ihn noch einigemale mit Wasser auf der Nutsche aus. Der feuchte übrig gebliebene Brei wurde im Exsikator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet, der nach einigen Tagen eine trockene, bröcklige, graugrüne Masse ergab, die sich mühelos zu Pulver verreiben ließ. Das in diesem Pulver enthaltene Barium mußte zu Versuchen wiederum entfernt werden, wobei man folgendermaßen vorging:

Es wurden 7 g Pulver, die ungefähr 200 ccm Lösung A entsprechen, im Mörser mit wenig Wasser zu einem dünnflüssigen Brei verrieben und dazu langsam 10prozentige Schwefelsäure tropfenweise solange zugegeben, bis sich mit Schwefelsäure in einem kleinen Probefiltrat keine Bariumionen mehr nachweisen ließen. Das nun stark kongosauer gewordene Gemenge wurde sofort mit 10prozentiger Natronlauge gegen Lakmus neutralisiert unter gleichzeitiger Kühlung durch kleine Eisstücke. Die durch die Zentrifuge vom dicken Bariumsulfatniederschlag gewonnene klare Flüssigkeit nannte man Lösung B. Die Lösung B wurde mit Wasser auf 80 ccm aufgefüllt und zu den Versuchen verwandt.

Die Versuche mit Muskel allein waren genau so zusammengesetzt wie in Tabelle 2; die Ansätze mit Lösung B und Muskel wurden wie folgt gemacht:

5 g Muskel
25 ccm Lösung B
20 ccm Kochsaft.

Tabelle 5.

(mg Milchsäure)

I. Muskel			II. Muskel mit Lösung B		
direkt	digeriert		direkt	digeriert	
	im Vakuum	mit Sauerstoff		im Vakuum	mit Sauerstoff
19,4	45,9	37,8	25,2	59,5	29,7
46,9	61,5	61,5	61,5	94,0	76,5
26,3	52,2	50,5	34,4	68,5	41,0
35,6	40,0	41,7	44,1+	89,1+	52,6+
25,2	41,5	38,6	27,4+	63,0+	36,2+

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß in Lösung B der unbekannte Stoff noch enthalten war. Die Lösung B zu den beiden letzten Versuchen I- unter II wurde aus einem Bariumpulver hergestellt, das mindestens 6 Wochen lang im evakuierten Exsikator über Schwefelsäure gestanden hatte und dabei nicht im geringsten an Wirksamkeit verlor. Man kann also den für die Hemmung der Milchsäurebildung verantwortlichen Stoff im „Bariumsalz" in wirksamer Form vorrätig halten.

Ein Vergleich der beiden direkten Versuche in Tabelle 5 mit und ohne Lösung B läßt einen verhältnismäßig geringen Milchsäuregehalt der Lösung B erkennen. Ferner ist von Interesse, daß die Milchsäure im Vakuumversuch bei Zusatz von Lösung B immer stärker vermehrt ist, als im Kontrollversuch ohne Lösung B. Hieraus geht hervor, daß Lösung B ein milchsäurebildendes Ferment enthält.

Im Laufe der verschiedenen Versuche und Prüfungen der Lösung B glaubte man vorübergehend, daß die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff in irgendeiner Form von den Pentosen des Muskels abhinge, da Lösung B wiederholt stark positive Orcin- und Resorcinreaktion auf Pentosen gab. Nach einem negativ ausgefallenen Probeversuch mit 5 g Muskel, 25 ccm Pufferlösung (pH = 7; m/15) und 20 ccm einer 1prozentigen Lösung von adenylsaurem Natrium wurde dieser Gedanke wieder fallen gelassen.

Die Lösung B enthielt, wie leicht einleuchtet aus der Verarbeitung des „Bariumsalzes" viele Phosphate und zwar: 1. aus der Pufferlösung und 2. aus dem Muskel. Die Phosphate waren sehr schwer zu entfernen und nur mit Mühe gelang es, sie mit Magnesiamixtur auszufällen; jedoch war jetzt die Restflüssigkeit auf den Muskel völlig wirkungslos.

Nun nahm man statt Pufferlösung 0,9prozentige physiologische Kochsalzlösung zur Herstellung von Lösung A, um somit die Gesamtmenge der Phosphate wesentlich zu vermindern. Wie folgende Versuche bewiesen, war die Wirkung des abfiltrierten Waschsaftes aus physiologischer Kochsalzlösung nicht geringer, als die des Waschsaftes aus Phosphatpuffer.

Man nahm

I. 5 g „Salz"muskel
25 ccm Puffer (p H = 7; m/15)
20 ccm Kochsaft

II. 5 g „Salz"muskel
25 ccm „Salz"waschsaft
20 ccm Kochsaft

Tabelle 6.

(mg Milchsäure)

I. Salzmuskel			II. Salzmuskel und Salzwaschsaft		
direkt	digeriert		direkt	digeriert	
	im Vakuum	mit Sauerstoff		im Vakuum	mit Sauerstoff
8.1	14.9	13,4	34,8	63,2	36,7
11.3	20,5	19,8	40,6	79,1	51,3
7,0	23,2	23,1	28,2	42,4	30,1

Wie bereits früher beschrieben wurde, kann Muskelwaschsaft durch Aceton von seinem Eiweiß befreit werden, indem man 5 Teile Aceton auf 4 Teile Waschsaft zusetzt. Das gleiche gilt auch für „Salz"waschsaft. Das klare Filtrat der Fällung aus Salzwaschsaft nennt man Lösung C.

In folgenden Versuchen wurde dieselbe Zusammensetzung wie in Tabelle 3 gewählt; nur statt Lösung A nahm man Lösung C.

Tabelle 7.

(mg Milchsäure)

I. Muskel			II. Muskel und Lösung C		
direkt	digeriert		direkt	digeriert	
	im Vakuum	mit Sauerstoff		im Vakuum	mit Sauerstoff
20.9	33,2	35,0	159,5	204,5	152,1
19.1	30,2	31,7	54,2	65,0	56,5

Wie Versuche von Tabelle 7 zeigen, enthält auch die Lösung C den Stoff, der mit Muskel die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff bewirkt.

Ferner ging man daran, auch aus Lösung C auf dieselbe Weise wie aus Lösung B ein Bariumpulver mit Bariumazetat herzustellen, was ungeahnte Schwierigkeiten bereitete.

Gießt man Lösung C auf kalt gesättigte Bariumazetatlösung, so entsteht nur ein geringer Niederschlag von Bariumphosphat; da ja nur die aus dem Muskel auswaschbaren Phosphate als unlösliche Bariumverbindungen ausfallen. Bei derselben Weiterbehandlung dieses Niederschlages, wie des Bariumsalzes aus Lösung A, ließ sich der gesuchte Stoff nicht mehr nachweisen. Daraus mußte gefolgert werden, daß der unbekannte Stoff kein unlösliches Bariumsalz bildet, sondern sehr wahrscheinlich an die Bariumphosphate adsorbiert wird. Von dem Adsorbens ist in Lösung C zu wenig vorhanden.

Auf Grund dieser Erfahrung ging man daran, nun den gesuchten Stoff direkt von seinem Adsorbens im Bariumsalz zu trennen.

Es wurden vier Versuchsanordnungen getroffen, bei denen jeweils 5 g Bariumsalz aus Lösung A mit 50 ccm Wasser mit verschiedener Wasserstoffionenkonzentration eine halbe Stunde lang geschüttelt wurden. Zum ersten Versuch wählte man ein pH = 9, zum zweiten ein pH = 7,6, zum dritten ein pH = 6,2 und zum vierten ein pH = 2,0. Die vier vom Bariumsalz abfiltrierten und gegen Lakmuspapier neutral gemachten Filtrate erwiesen sich bei einer Prüfung als wirkungslos.

Aus der Erkenntnis, daß der gesuchte Stoff adsorbierbar ist, wollte man in weiteren Versuchen mit Aluminiumgel nach Willstätter den gesuchten Stoff aus Lösung B eluieren.

150 ccm Lösung B und 250 ccm Aluminiumgel werden mit 100 ccm einer m/12 Lösung von primärem Kaliumphosphat und ca. 8 ccm 25prozentiger Phosphorsäure solange angesäuert, bis die Lösung ein pH = 6–6,2 hat. Das Gemenge wird, nachdem es bereits eine halbe Stunde

lang geschüttelt wurde auf der Nutsche scharf abgepreßt. Dieses klare Filtrat, das man mit Lösung D bezeichnete, läßt man in Vakuum bei 40° auf ca. 80 ccm eindampfen. Ferner gibt man 500 ccm einer m/12 Lösung von sekundärem Natriumphosphat bei pH = 7,2 bis 7,4 dem Nutschenrückstand zum Zwecke der Aufschlämmung hinzu und filtriert das Gemenge nach einer dreistündigen Durchschüttelung ab. Das nun erhaltene Filtrat bezeichnete man mit Lösung E.

Zu folgenden Versuchen wurden die Lösungen D und E mit 10 prozentiger Natronlauge bzw. mit 10 prozentiger Schwefelsäure gegen Lakmus neutralisiert. Zu den Versuchen mit Muskel allein wurde die gleiche Zusammensetzung wie in Tabelle 2 gewählt; die übrigen Ansätze wurden nach folgender Aufstellung gemacht.

II. Versuche mit Muskel und Lösung D.

5 g Phosphatmuskel
25 ccm Lösung D
20 ccm Kochsaft

III. Versuche mit Muskel und Lösung E.

5 g Phosphatmuskel
25 ccm Lösung E
20 ccm Kochsaft

Tabelle 8.

(mg Milchsäure)

I. Muskel			II. Muskel u. Lösung D			III. Muskel u. Lösung E		
direkt	digeriert		direkt	digeriert		direkt	digeriert	
	im Vakuum	mit Sauerstoff		im Vakuum	mit Sauerstoff		im Vakuum	mit Sauerstoff
10,2	28,4	27,2	16,3	40,2	42,2	14,8	13,0	11,0
12,4	32,1	30,9	13,5	45,8	43,9	15,1	14,7	14,0

Wie aus Tabelle ersichtlich, ist weder in II noch in III eine Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff

außerhalb der Fehlergrenze zu erkennen. Offenbar ist ein milchsäurebildendes Ferment in Lösung E nicht vorhanden. Jedoch läßt sich trotz negativen Ausfalles der Versuche nicht erkennen, ob schließlich doch der gesuchte Stoff in Lösung E enthalten ist. In Lösung D dagegen ist das milchsäurebildende Ferment vollständig vorhanden, was schließlich in weiteren Versuchen einen Weg zur Gewinnung dieses Fermentes im Muskel zeigt.

In der Darstellung des Na Salzes aus Barytsalz wurde eine bessere Methode gefunden.

Anstatt der Umsetzung des Barytsalzes mit H_2SO_4 und nachträglicher Neutralisation, Umsetzung mit 1prozentigem Na_2SO_4.

Man nimmt eine beliebige Menge des frisch mit Bariumazetat gefällten Barytsalzes und verreibt dieses mit einer 1prozentigen Na_2SO_4 Lösung. Nach kurzer Zeit haben sich alle Barium-Inonen des Barytsalzes an SO_4 gebunden. Durch Filtration einer Probe überzeugt man sich von der Vollständigkeit des Umsatzes. Die filtrierte klare Lösung ergibt bei Zusatz zu ausgewaschenem und abgepreßtem Muskel eine Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff.

Kontrollversuch:

Tabelle 9.

(mg Milchsäure)

I. Muskel			II. Muskel mit Zusatz		
direkt	digeriert		direkt	digeriert	
	im Vakuum	mit Sauerstoff		im Vakuum	mit Sauerstoff
18	33	33	18,2	33,0	19,5
			17,3	35,5	26,5

Zusammenfassung

1. Es werden Verfahren angegeben zur Reinigung einer Substanz, die für die Hemmung der Glykolyse durch O_2 notwendig ist.

2. Es wurde gefunden, daß man eine in obigem Sinne wirksame Lösung erhält, wenn man das Bariumsalz, das aus dem enteiweißten Waschsaft gewonnen wurde, mit Natriumsulfat von Barium abtrennt.

Am Ende meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. A. Hahn für die gütige Ueberlassung des Themas und die mir erteilten Ratschläge bestens danken. Ebenfalls sage ich Dank Herrn Dr. H. Niemer für seine Anleitung zu den Versuchen und deren Förderung.

Schrifttum

1. Embden: B.Z. 45. 1912; 45 und 63.
2. Hahn-Dürr: Z. f. Biol. 95, 298, (1934).
3. Hahn-Niemer: Z. f. Biol. 98, VI. (1938).
4. Hahn-Fischbach-Niemer: Z. f. Biol. 91, 53, (1930).
5. Hahn-Fischbach-Niemer: Z. f. Biol. 1930; 91, Heft 1.
6. Warburg: Stoffwechsel der Tumoren, Berlin 1926.
7. Meyerhof: Pflügers Archiv 188, 135 (1921).
8. Hahn und Niemer: Z. f. Biologie (1926) Bd. 97, Heft 2.
9. Friedmann, Cotonio, Shaffer: Inl. Biol.Chem. 73, 1927, 334 und 359.
10. Friedemann-Graeser: Inl.Biol.Chem. 100, 1933, 291.

Mein Lebenslauf

Ich wurde als zweites Kind der Landwirtseheleute Karl und Korolina Panwolf am 26. Dezember 1908 zu Langenhaslach geboren. Meine Kinderjahre verbrachte ich im Elternhause; hierauf besuchte ich die Volksschule und Volksfortbildungsschule in meinem Heimatdorfe von Mai 1914 bis Ostern 1924. Mit 18½ Jahren begann ich am 10. Mai 1927 in einer Privatschule in Aschaffenburg a. M. die Mittelschulstudien, die ich nach Ablegung der Reifeprüfung am 6. April 1933 am hum. Gymnasium zu Dillingen a. d. Donau zum Abschluß brachte. Das Sommer-Semester 1933 verbrachte ich an der philosoph. Hochschule St. Stefan in Augsburg. Während der übrigen Semester studierte ich an der Universität in München Medizin, wo ich im Winterhalbjahr 1938/39 das medizin. Staatsexamen ablegte.

München, den 13. Februar 1939.

Wilhelm Panwolf.